ชื่อวิทยานิพนธ์	การคัดเลือกและสภาวะที่เหมาะสมต่อการผลิตโคพอลิเมอร์จากแบคทีเรียสังเคราะห์แสงทนเค็มสายพันธุ์กลาย
ผู้เขียน	นายเขมรัฐ เขมวงศ์
สาขาวิชา	เทคโนโลยีชีวภาพ
ปีการศึกษา	2549

บทคัดย่อ

ทำการเทียบเคียงแบคทีเรียสังเคราะห์แสงสายพันธุ์ดั้งเดิม ES16 และสายพันธุ์กลาย N20 และ U7 โดยการใช้ทั้งเทคนิคมาตรฐานและเทคนิคทางชีวโมเลกุล สำหรับเทคนิคมาตรฐาน อาศัยคุณสมบัติทางสรีรวิทยา สัณฐานวิทยา การเคลื่อนที่ องค์ประกอบของรงควัตถุ การใช้แหล่งคาร์บอนเป็นสารอาหาร ความต้องการวิตามิน รวมทั้งคุณสมบัติการเจริญในสภาวะไร้อากาศ และมีอากาศพบว่าแบคทีเรียสังเคราะห์แสงทั้ง 3 สายพันธุ์เป็นแบคทีเรียแกรมลบ เซลล์รูปไข่ เมื่อเลี้ยงในสภาวะไร้อากาศ-มีแสง (3000 ลักซ์) สารละลายเซลล์มีสีน้ำตาลแดง แต่จะเป็นสีชมพูบานเย็นเมื่อเลี้ยงในสภาวะมีอากาศ-ไร้แสง มีการเพิ่มจำนวนโดยการแบ่งเซลล์แบบ binary fission มีรงควัตถุสำหรับการสังเคราะห์แสงที่ประกอบด้วยแบคเทอริคลอโรฟิลล์ชนิด *a* และสารสีกลุ่มแคโรทินอยด์ สำหรับการใช้สารอาหารพบว่าทาเทรทเป็นสารที่ใช้เทียบเคียงชนิดของแบคทีเรียสังเคราะห์แสงเป็น *Rhodobacter sphaeroides* การเทียบเคียงโดยใช้เทคนิค 16S rDNA ยืนยันผลการเทียบเคียงข้างต้น เมื่อเลี้ยงเชื้อในอาหารเลี้ยงเชื้อ G5 ดัดแปลงที่มีอะซิเตทเป็นแหล่งคาร์บอนและกลูตาเมทเป็นแหล่งไนโตรเจน ภายใต้สภาวะให้อากาศ-ไร้แสง และบ่มที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส บนเครื่องเขย่าความเร็ว 200 รอบต่อนาที พบว่าเชื้อผลิตโฮโมพอลิเมอร์ชนิดพอลิเบต้าไฮดรอกซีบิวทิเรท (Poly-β-hydroxybutyrate; PHB) โดยสายพันธุ์กลายมีศักยภาพในการผลิต PHB ดีกว่าสายพันธุ์ดั้งเดิมจึงเลือกสายพันธุ์กลายในการผลิตโคพอลิเมอร์ เมื่อศึกษาผลของแหล่งและความเข้มข้นของคาร์บอนร่วม (กรดไขมันระเหยง่าย) ต่อการผลิตโคพอลิเมอร์ โดยปรับอัตราส่วนระหว่างโซเดียมอะซิเตท ต่อกรดโพรพิโอนิก หรือ กรดวาเลอริกเป็น 40/0 40/20 40/40 และ 40/80 พบว่าคาร์บอนร่วมมีผลให้เกิดการชักนำให้มีการผลิต และสะสมโคพอลิเมอร์ชนิดพอลิเบต้าไฮดรอกซีบิวทีเรทโคเบต้าไฮดรอกซีวาเลอเรท (Poly-β-hydroxybutyrate-co-β-hydroxyvalerate ; PHBV) พบว่า *R. sphaeroides* U7 มีศักยภาพในการผลิตโคพอลิเมอร์ดีกว่า *R. sphaeroides* N20 โดยใช้อะซิเตทร่วมกับกรดโพรพิโอนิกและอะซิเตทร่วมกับกรดวาเลอริกที่อัตราส่วนโมล 40/40 ให้ปริมาณ PHA ภายในเซลล์สูงสุดใกล้เคียงมากคือ 77.7% และ77.4% ตามลำดับ อย่างไรก็ตาม การใช้อะซิเตท

ร่วมกับกรดวาเลอริกความเข้มข้น 40 มิลลิโมลาร์ ให้ส่วนที่เป็น HV (HV unit fraction) 84.8% สูงกว่าการใช้กรดโพรพิโอนิกที่ความเข้มข้นเดียวกัน (19.1%) ถึง 4 เท่าและเมื่อศึกษาแหล่งไนโตรเจนทั้งอนินทรีย์และอินทรีย์ไนโตรเจน อุณหภูมิ และสภาวะการเลี้ยงเชื้อที่มีและไม่มีการให้อากาศต่อการผลิตโคพอลิเมอร์จากเชื้อ *R.sphaeroides* U7 พบว่าไม่จำเป็นต้องเติม $(NH_4)_2SO_4$ ในอาหารเลี้ยงเชื้อ ส่วนการเจริญ ปริมาณรงควัตถุและพอลิเบต้าไฮดรอกซีบิวทิเรทจะลดลงเมื่อลดปริมาณยีสต์สกัด พีเอชเริ่มต้นที่เหมาะสมของอาหารเลี้ยงเชื้อเป็น 7.0 สภาวะที่เหมาะสมในการผลิตพอลิเบต้าไฮดรอกซีบิวทิเรท คือ สภาวะไร้อากาศ-ให้แสง ที่อุณหภูมิ 30°C สำหรับการเลี้ยงในถังหมักขนาด 5 ลิตร พบว่ามีการเจริญและการผลิตพอลิเมอร์ต่ำกว่าการเลี้ยงเชื้อในฟลาสก์ ที่อัตราการให้อากาศ 0.5 vvm เชื้อมีปริมาณ PHA สูงสุด 65.2% ที่ 60 ชั่วโมง และที่อัตราการให้อากาศ 1.5 vvm เชื้อให้ปริมาณเซลล์สูงสุด 7.9 กรัมต่อลิตร โดยกำหนดอัตราการกวน 200 รอบต่อนาที เมื่อทดสอบผลของสารละลายต่อการสกัดโคพอลิเมอร์จากเซลล์แห้ง พบว่าการใช้คลอโรฟอร์มสามารถสกัด PHBV ได้อย่างสมบูรณ์ เมื่อพิจารณาจากโครมาโตแกรมสเปคตรัมจาก FTIR และ ^{13}C-NMR พบว่าโคพอลิเมอร์คือ PHBVประกอบด้วยหน่วยย่อย (building block) 2 ชนิดคือ β-hydroxybutyrate (β-HB) และ β-hydroxyvalerate (β-HV) ซึ่งวิเคราะห์ได้ด้วย GC-MS จากการศึกษาคุณสมบัติทางกายภาพของ PHBV ที่ผลิตได้พบว่าผลึกพอลิเมอร์มีลักษณะเป็นทรงกลมสีขาวเมื่อมีความเข้มข้นไม่ยิ่งยวดในสารละลายคลอโรฟอร์ม กรณีเตรียม PHBV ความเข้มข้นสูงในคลอโรฟอร์ม ลักษณะพอลิเมอร์ที่ได้มีการเชื่อมต่อกันเป็นโครงข่าย และมีค่าอุณหภูมิหลอมเหลวของผลึก (T_m) เท่ากับ 166°C และอุณหภูมิแข็งตัวของผลึก (T_c) มีค่าเท่ากับ 121°C มีความเป็นผลึกเท่ากับ 66.84 % น้ำหนักโมเลกุลเฉลี่ย (M_v) โคพอลิเมอร์ที่ได้อยู่ในช่วง 200,000-500,000 ดาลตัน

Thesis Title	Selection and Optimization for Production of Copolymer from Halotolerant Photosynthetic Bacterial Mutant Strain
Author	Mr. Kemarajt Kemavongse
Major Program	Biotechnology
Academic Year	2006

ABSTRACT

Photosynthetic bacterial wild type strain ES16 and mutant strains N20 and U7 were identified using both classical and molecular techniques. Classical identification technique was based on morphology, motility and pigment composition, physiological properties such as carbon utilization, vitamin requirement and ability to multiply in anaerobic and aerobic condition. The strains were Gram-negative, ovoid-shape bacteria, a brownish-red culture under aerobic-light (3000 lux) condition but appeared as deep pink culture under aerobic-dark condition, reproduced by binary fission and formed an internal photosynthetic membranes as vesicle which contained bacteriochlorophyll *a* and carotenoids. The mutants were identified as *Rhodobacter sphaeroides* according to nutrient requirement especially tartrate utilization which was the main key dividing this species from others in the same genus**.** The 16s rDNA technique was employed and it confirmed the above results. The modified G5 medium containing sodium acetate and sodium glutamate as carbon and nitrogen sources was used for PHB production under aerobic-dark cultivation on a shaker (200 rpm) at 37°C. The mutants showed higher potential PHB production than the wild type strain, therefore both mutant strains were used for the copolymer production. Studies on effect of auxiliary carbon source (volatile fatty acid, VFA) and concentration on copolymer production were conducted. Both combinations of acetate with propionate and acetate with valerate in the ratio of 40/0, 40/20, 40/40 and 40/80 were found to induce the accumulation of poly-β-hydroxybutyrate-co-β-hydroxyvalerate (PHBV) within the cells. *R. sphaeroides* U7 produced higher copolymer than *R. sphaeroides* N20. Acetate with propionate and acetate with valerate in the molar ratio of 40/40 gave very similar highest PHA content of 77.7% and 77.4% respectively. However, using acetate with valerate at the molar ratio of 40 mM gave the HV unit fraction of 88.8% which was 4 times higher than using acetate with propionate at the same molar

ratio (19.1%). Effects of nitrogen source both inorganic and organic, temperature and aerobic-anaerobic conditions on copolymer production from *R. sphaeroides* U7 were investigated. It was found that the $(NH_4)_2SO_4$ was not needed in the culture medium. Growth, pigmentation and PHB production decreased with the decrease of yeast extract. Optimum pH of cultivation medium was at pH 7.0. The optimum condition was cultivation under anaerobic-light at 30°C. Cultivation in a 5 L fermentor gave lower growth and polymer production than cultivation in the shake flask. At 0.5 vvm aeration rate, the strain accumulated the highest PHA of 65.2% after 60 h cultivation and the highest biomass of 7.9 g/l was obtained at 1.5 vvm aeration rate with agitation speed of 200 rpm. Studies on effect of solvent on extraction of copolymer from the dried cells revealed that chloroform was able to extract PHBV completely. Chromatogram spectrum obtained by both FT-IR and ^{13}C-NMR indicated that this polymer was PHBV consisted of β-hydroxybutyrate (β-HB) and β-hydroxyvalerate (β-HV) as building block measured by GC-MS following commercial standard PHBV pattern. For general physical properties, the copolymer had white spherical shape when chloroform was used in suitable portion. If high concentration of PHBV was present in the chloroform, the polymer formed the network structure. The melting temperature (Tm) was 166°C and crystalline temperature (Tc) was 121°C with % crystallinity of 66.84. The molecular weight was between 200,000 to 500,000 dalton measured by intrinsic viscosity.